вет. наук. Саранск., 2002. 148 с.
9. Лащ А.П., Зенкин А.С. Перспективы применения цереброспинальной жидкости как компонента питательных сред/ Матер. Научн. Конф. «XXX Огаревские чтения». Саранск, 2001. С. 169-171.
10. Харлашкин А.В. Использование цереброспинальной жидкости при искусственном осеменении свиней./Материалы VIII научной конференции молодых ученых. Саранск, 2008. С. 69-70.

УДК: 576.858.083.35:57.085.23

К.В. Кулешов, О.М. Гринкевич, Р.Я. Подчерняева, Л.П. Дьяконов
ВНИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко РАСХН (ВИЭВ);
ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН

ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ВЫСОЧУВСТВИТЕЛЬНЫМИ МЕТОДАМИ АНАЛИЗА ДНК

Введение

Использование клеточных культур в различных областях фундаментальной и прикладной науки требует надежных критериев стандартизации и оценки соответствия культивируемых клеток первоначально полученным линиям (Новохатский и др., 1976; 1979; Царева и др., 1986). Использование клеток с отсутствием идентификационных характеристик ставит под сомнение объективность полученных результатов. Для решения данных проблем необходимо развитие подходов, связанных с тщательной и полной разработкой процедуры идентификации клеточных линий. Важными являются научная обоснованность и возможность стандартизации используемых методик и подходов.

В настоящее время для контроля видовой идентичности клеточных линий применяются кариологический и изоферментный методы, но они достаточно трудоемки и обладают меньшей чувствительностью и возможностью стандартизации в сравнении с современными методами, основанными на полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Buehring et al., 2004; Gilbert et al., 1990; Kaplan and Hukku, 1998). Одним из наиболее существенных преимуществ ПЦР является высокая аналитическая специфичность, чувствительность и возможность стандартизации анализа результатов различных лабораторий.

Объектом нашего исследования являлись клеточные линии, полученные от разных видов животных, и депонированных в лаборатории культур тканей НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН. Для идентификации клеточных линий банка клеток нами предложено применение двух подходов. Первый – универсальная методика видовой идентификации, базирующаяся на концепции «Штрих-код жизни» (Armstrong and Ball, 2005; Hebert and Gregory, 2005). Существо метода сводится к секвенированию 650-нуклеотидной последовательности 5’-концевого участка гена митохондриальной ДНК (мтДНК). Второй подход – анализ видовой принадлежности каждой клеточной линии с использованием разработанной в лаборатории клеточной биотехнологии ВИЭВ видоспецифической ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной (ГФ) детекцией в режиме реального времени. Метод позволяет идентифицировать следующие виды животных: *Homo sapiens* (человек), *Sus scrofa* (свинья), *Bos taurus* (корова), *Canis familiaris* (собака), *Felis catus* (кошка), *Cercopithecus aethiops* (африканская зеленая мартышка), *Equus caballus* (лошадь), *Oryctolagus cuniculus* (кролик), *Ovis aries* (овца), *Mesocricetus auratus* (золотистый хомяк), *Mus musculus* (мышь), *Rattus norvegicus* (серая крыса), *Cricetus gricetus* (китайский хомяк).

Материалы и методы

Культуры клеток

Объектом исследования служили линии клеток млекопитающих, депонированные в НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН.

Амплификация и секвенирование участка COI гена.

Таблица 1

Клеточные культуры, использованные в работе.

№ п\п	Название линии	Органное или тканевое происхождение	Видовая принадлежность по паспортным данным
1	CH-5	гепатома	человек
2	GL-6 (U-251)	глиобластома	человек
3	HCT-116	рак толстой кишки	человек
4	Hep-2	карцинома гортани	человек
5	L41	моноцитарный лейкоз	человек
6	Lunet	гепатома	человек
7	СПЭВ	почка эмбриона	свинья
8	PK-15	почка эмбриона	свинья
9	Vero	почка взрослого	зеленая мартышка
10	MK-2	почка эмбриона	макака резус
11	FRhK-4	почка плода	макака резус
12	MDBK	почка эмбриона	корова
13	BSR	клон BHK-21	сирийский хомяк
14	BHK-21	почка эмбриона	сирийский хомяк
15	BHK-21	почка эмбриона	сирийский хомяк
16	CHO K1	яичник	китайский хомяк
17	ЭПНТ-5	глиобластома	мышь
18	L929	фибробласты	мышь
19	C-6	глиобластома	крыса
20	MDCK	почка эмбриона	собака
21	CRFK	почка эмбриона	кошка
22	FS	селезенка эмбриона	кошка
23	ПС	почка эмбриона	сайга

Для амплификации 658-нуклеотидной последовательности 5' - концевого участка COI гена митохондриальной ДНК (мтДНК) использованы праймеры VF1_t1 (5'- TGTAAAACGACGGCCAGTTCT CAACCAACCACAAAGACATTGG-3') и VR1_t1 (5'- CAGGAAACAGCTATGACT AGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3'), а для секвенирования M13F (-21) (5'-TGTAAAACGACGGCCAGT-3'), M13R (-27) (5'- CAGGAAACAGCTATGAC-3') (Natalia V. Ivanova, 2007). Для амплификации и секвенирования участка гена цитохрома b отдельных клеточных линий использованы праймеры L14724 (5'-CGA AGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG -3') и H15149 (5'-AAACTGCAGCCCCTC AGAATGATATTTGTCCTCA-3') (Irwin et al., 1991).

Температурный профиль термоциклирования для амплификации и COI и cytb был общий. ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технология, Россия). Реакционная смесь (25 мкл) включала образец ДНК, праймеры (120 – 240 нМ каждого), дНТФ (200 мкМ каждого), 2 мМ $MgCl_2$, Taq-полимеразу (1,5 ед., СибЭнзим, Россия), 10х ПЦР-буфер (СибЭнзим, Россия). Температурный цикл был следующим: начальная денатурация 95 °C 5 минут, затем 42 раунда амплификации: 95 °C – 20 секунд, 50 °C – 20 секунд, 72 °C – 20 секунд. Полученный продукт анализировали в 1,5% агарозном геле. Затем секвенировали обе цепи ПЦР-продукта, используя праймеры M13F (-21) и M13R (-27).

Построение филогенетических дере-

Таблица 2

Видовая принадлежность клеточных линий, депонированных в лаборатории культур тканей НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН

№ п\п	Линия клеток	Исходная видовая принадлежность	Установлено методом ПЦР-РВ	Установлено методом секвенирования
1	CH-5 (30.06.08), 7п	человек	человек	-
2	GL-6 2п*	человек	корова	корова
3	GL-6 (27.11.06) 5п	человек	человек	человек
4	Hep-2 (14.12.04) 4п	человек	человек	-
5	L41 (08.07.05) 31 п	человек	человек	-
6	Lunet (06.10.08) 10 п	человек	человек	-
7	ЛЭЧ (16.06.08) 21п	человек	человек	-
8	MK-2 (30.05.80) 2п	макака резус	мышь	мышь
9	FRhK (17.12.03) 3п	макака резус	–	макака резус
10	Vero (28.07.08) 8п	зеленая мартышка	зеленая мартышка	зеленая мартышка
13	L929 (20.09.04) 3п	мышь	мышь	-
14	L929 (18.02.02) 4п	мышь	мышь	мышь
15	ЭПНТ-5 (2.06.08) 2п	мышь	мышь	
16	C-6 *	крыса	крыса	крыса
17	CHO-K1 (6.11.06, исх.30.12.77) 11п	китайский хомяк	человек	человек
18	CHO-K1 (06.11.06, исх 09.06.77)	китайский хомяк	человек	человек
19	CHO-K1 (26.06.06, исх.16.05.78)	китайский хомяк	китайский хомяк	китайский хомяк
20	CHO-K1 (26.06.06, исх. 01.08.80)	китайский хомяк	китайский хомяк	китайский хомяк
21	CHO-K1 (27.10.97)	китайский хомяк	китайский хомяк+человек	китайский хомяк
22	BHK-21*	сирийский хомяк	сирийский хомяк	сирийский хомяк
23	BSR*	сирийский хомяк	сирийский хомяк	-
24	СПЭВ*	свинья	свинья	свинья
25	PK-15*	свинья	свинья	свинья
26	MDBK*	корова	корова	-
27	MDCK (11.10.04) 3п	собака	собака	-
28	MDCK*	собака	собака	-
29	CRFK*	кошка	кошка	-
30	FS*	кошка	кошка	-
31	ПС*	сайга	–	сайга (COI?, cytb)

* линии получены лабораторией культур тканей НИИ вирусологии им.Д.И.Ивановского РАМН из других источников.

вьев секвенированных последовательностей проводили методом объединения ближайших соседей (neighbour-joining) (Saitou and Nei, 1987); попарные генетические дистанции между нуклеотидными последовательностями рассчитывали в программе Mega 4 (Tamura et al., 2007) по двухпараметрической модели – Kimura-2-parameter. Достоверность полученных филогенетических деревьев статистически проверяли бутстреп-анализом (число повторов 1000). Чтобы наглядно продемонстрировать, что полученные последовательности соответствуют определенным видам животных, использовали референтные последовательности гена COI разных видов, заимствованных из базы данных BOLD (Ratnasingham and Hebert, 2007).

Постановка ПЦР-РВ

Амплификацию с детекцией в режиме реального времени проводили на приборе RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия) с использованием разработанной в нашей лаборатории панели видоспецифических праймеров и зондов для идентификации 13 видов млекопитающих. ПЦР смесь в объеме 25 мкл включала 300 нМ каждого из двух видоспецифических праймеров, 120 нМ зонда, дНТФ (200 мкМ каждого), 1хПЦР-буфер с ионами магния и Taq-полимеразой (Синтол, Россия) и образец выделенной ДНК в объеме 10 мкл. Температурный цикл был следующим: начальная денатурация – 95 °С 5 минут, затем 5 раундов с повышенной температурой отжига без детекции флуоресцентного сигнала: 95 °С – 20 секунд, 61 °С – 25 секунд, 72 °С – 20 секунд. Последующие 35 раундов проводили с детекцией флуоресценции на стадии отжига праймеров, 95 °С – 20 секунд, 60 °С-25 секунд, 72 °С – 20 секунд.

Результаты исследований

Результаты анализа видовой принадлежности клеточных линий приведены в табл.1. Проанализировано 7 клеточных линий, полученных из опухолевых или нормальных тканей человека: CH-5, GL-6, Hep-2, L41, Lunet, ЛЭЧ-Т. Установлено, что все клеточные линии из тканей человека, кроме одной, принадлежат к виду *Homo sapiens*. Линия GL-6 (U-251), полученная лабораторией из другого источника, по видовой принадлежности относилась к виду *Bos taurus*. Исследование закладок линии GL-6, культивируемой длительное время в НИИ вирусологии им.Д.И. Ивановского РАМН, показало ее принадлежность к *Homo sapiens*.

При анализе клеточных линий FRhK и MK-2 с использованием видоспецифической ПЦР-РВ показано, что линия MK-2 принадлежала к виду *Mus musculus,* в то время как линия FRhK не относилась ни к одному из 13 исследованных видов. Анализ нескольких закладок клеточной линии CHO-K1, депонированной в криобанке лаборатории в разные годы, показал, что в первой закладке обнаруживалась ДНК только человека, во второй и третьей закладках ДНК только китайского хомячка, в четвертой закладке выявлена смесь ДНК человека и ДНК китайского хомячка. Линии BHK-21, BSR, СПЭВ, PK-15, MDBK, MDCK, CRFK и FS соответствовали по видовой принадлежности исходным данным, примесей ДНК иных видов не обнаружено.

Также для видовой идентификации клеточных культур применяли метод секвенирования 5'-концевого участка гена, кодирующего субъединицу I цитохром с-оксидазы. Результаты филогенетического анализа секвенированных последовательностей клеточных линий подтверждают результаты видоспецифической ПЦР (рис. 1). Секвенированные последовательности, полученные из клеточных культур и последовательности, полученные из нормальных тканей животных (референтные последовательности) кластеризуются в отдельные группы, которые соответствуют разным видам животных, при этом топология построенного дерева подтверждается высокими значениями бутстреп-анализа. Данный метод позволил идентифицировать видовую принадлежность клеточной линии FRhK, которая полностью соответствует виду *Macacus mulatta*. Вместе с тем, смесь ДНК человека и китайского хомячка по секвенированию полностью соответствует виду *Homo sapiens*.

При анализе последовательностей участка гена COI мы не обнаружили референтные последовательности данного гена для вида *Saiga tatarica* в базах данных, поэтому для дальнейшего анализа мы секвенировали участок гена, кодирующего цитохром b. Сравнение последовательности участка гена cytb клеточной линии ПС с базой данных показало 100%-е сходство с последовательностями, относящимися к виду *Saiga tatarica*. Поэтому последовательность гена COI с высокой вероятностью можно отнести к виду *Saiga tatarica*.

Выводы

Многолетняя история культивиро-

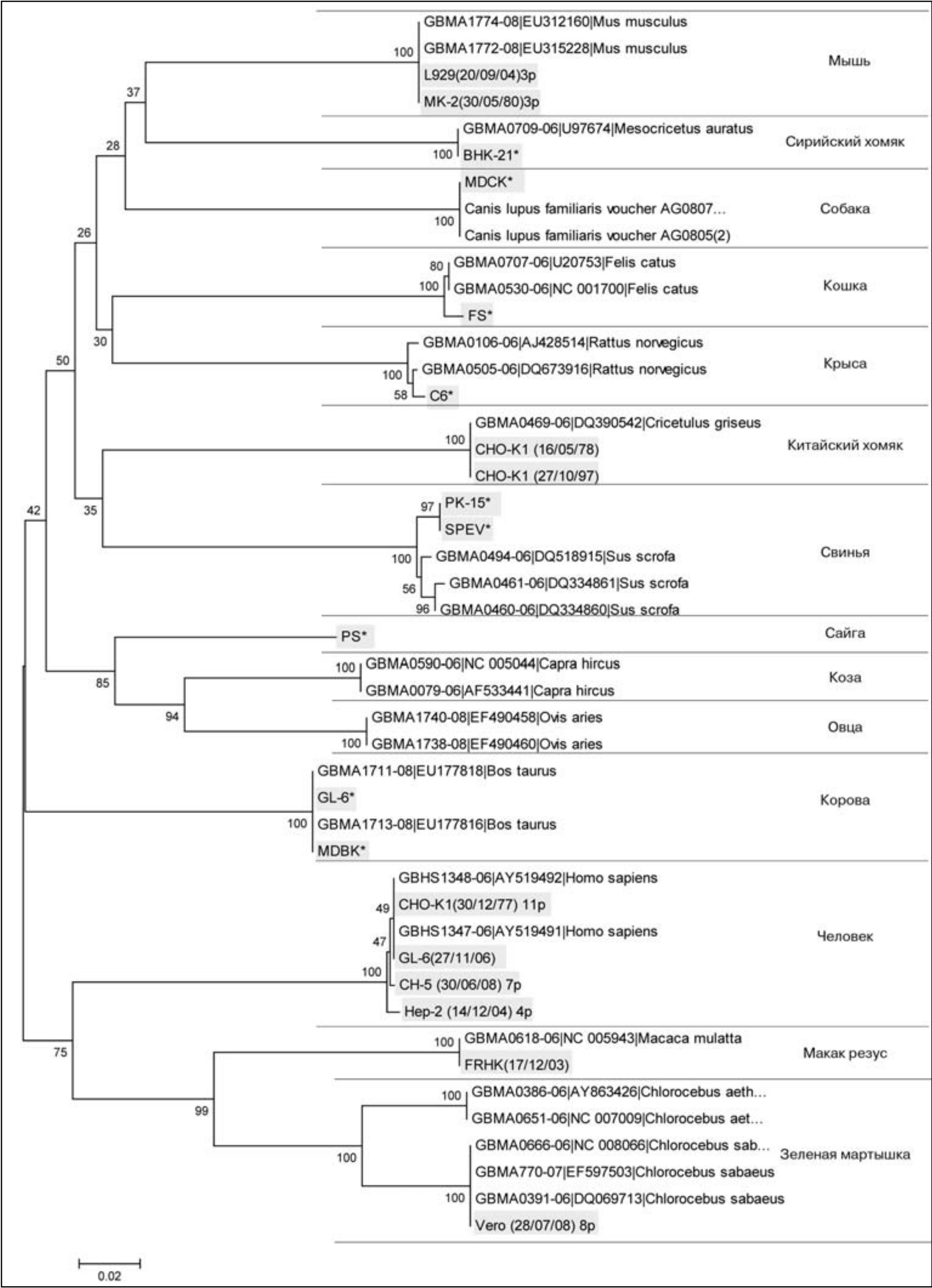


Рис. 1. Филогенетический анализ клеточных линий на основе последовательностей участка гена COI. В качестве референтных использованы последовательности, депонированные в базе данных BOLD. Горизонтальными линиями выделены группы последовательностей, относящихся к определенному виду животных.

вания клеток млекопитающих насчитывает немало случаев межвидовой клеточной и внутривидовой контаминации культур, происходящей при получении новых линий и при одновременном культивировании нескольких линий клеток (Gartler, 1968; Simpson and Stulberg, 1963; Stulberg et al., 1961). В данной работе нами проведен анализ 31 клеточной линии от 11 видов млекопитающих. В число исследуемых клеточных линий входили как культуры, поддерживаемые в течение

длительного времени внутри лаборатории, так и культуры клеток, полученные лабораторией из других источников. Выявлено 5 случаев ошибочной трактовки видовой принадлежности той или иной клеточной линии.

В сравнении с методами кариологического и изоферментного анализа, комплексное применение видоспецифической ПЦР и секвенирования генов митохондриальной ДНК, более удобно и позволяет быстро установить видовую принадлежность той или иной клеточной линии. Вместе с тем, полученные данные указывают на необходимость более тщательного контроля за клеточными культурами, особенно в крупных специализированных коллекциях. Мы считаем, что такой контроль предполагает следующие меры:

1. Описание генетических маркеров (хромосомных, биохимических, ДНК-маркеров) непосредственно при получении каждой новой клеточной культуры, т.е. присвоение ей «паспорта»;

2. При поступлении линии в лабораторию от других исследователей или клеточных банков производить анализ линии и сравнение ее настоящей характеристики с описанными для нее ранее;

3. При отсутствии соответствующего описания клеточной линии ее чистоту с относительной уверенностью можно установить, сравнивая ее характеристики с известными характеристиками других клеточных линий, особенно поддерживаемых параллельно с изучаемой;

4. В процессе культивирования клеточной линии необходимо внимательно наблюдать за сохранением или изменением ее морфологических характеристик, скорости роста и др., которые могут служить указанием на контаминацию; необходимо периодически проводить кариологический, изоферментный и молекулярно-генетический анализ клеточных линий.

РЕЗЮМЕ

Представлены данные изучения клеточных линий коллекции на базе лаборатории культур тканей НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН. Исследована 31 линия от 12 видов животных с использованием методов видоспецифической ПЦР и секвенирования участков мтДНК. В 5 случаях выявлена ошибочная видовая принадлежность клеточных линий, как культивируемых внутри лаборатории, так и приобретенных в ходе сотрудничества с другими научно-исследовательскими организациями.

SUMMARY

Aiming at identification of tissue and species origin of mammalian cell lines collected at Ivanovsky Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences, we analyzed 31 cell lines initially isolated in the institute or donated by collaborators. The species-specific polymerase chain reaction and direct sequencing of mitochondrial DNA demonstrated that in 5 cases the species origin of the cell line has been misinterpreted. The detailed protocols of the techniques used for DNA-based species identification are presented.

Литература

1. Новохатский, А.С., Михайлова, Г.Р., Царева А.А. (1976) 'Проблема контаминации клетками и новые подходы к контролю перевиваемых линий', Вопросы вирусологии, С. 396-408.
2. Новохатский, А.С., Царева, А.А., Михайлова, Г.Р. и Жданов, В.М. (1979) 'Контаминация клеток перевиваемых линий', Вопросы вирусологии, С. 432-439.
3. Царева, А.А., Колокольцова, Т.Д., Немцов, Ю.В., Исаенко, А.А. и Бочкова, Т.Г. (1986) 'Идентификация линий клеток насекомых', Вопросы вирусологии, С. 87-95.
4. Armstrong, K.F. and Ball, S.L. (2005) ‹DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification›, Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, Vol. 360, No. 1462, C. 1813-1823.
5. Buehring, G.C., Eby, E.A. and Eby, M.J. (2004) 'Cell line cross-contamination: how aware are Mammalian cell culturists of the problem and how to monitor it?', In Vitro Cell Dev Biol Anim, Vol. 40, No. 7, pp. 211-5.
6. Gartler, S.M. (1968) 'Apparent Hela cell contamination of human heteroploid cell lines', Nature, Vol. 217, No. 5130, pp. 750-1.
7. Gilbert, D.A., Reid, Y.A., Gail, M.H., Pee, D., White, C., Hay, R.J. and O'Brien, S.J. (1990) 'Application of DNA fingerprints for cell-line individualization', Am J Hum Genet, Vol. 47, No. 3, pp. 499-514.
8. Hebert, P.D. and Gregory, T.R. (2005) 'The promise of DNA barcoding for taxonomy', Syst Biol, Vol. 54, No. 5, pp. 852-9.
9. Irwin, D.M., Kocher, T.D. and Wilson, A.C. (1991) 'Evolution of the cytochrome b gene of mammals', J Mol Evol, Vol. 32, No. 2, pp. 128-44.
10. Kaplan, J. and Hukku, B. (1998) 'Cell line characterization and authentication', Methods Cell Biol, Vol. 57, pp. 203-16.
11. Natalia V. Ivanova (2007) 'Universal primer cocktails for fish DNA barcoding', Molecular Ecology Notes, Vol. 7, No. 4, pp. 544-548.
12. Ratnasingham, S. and Hebert, P.D.N. (2007) '- bold: The Barcode of Life Data System (http://www.barcodinglife.org)', Vol. - 7, pp. - 364.
13. Saitou, N. and Nei, M. (1987) 'The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees', Mol Biol Evol, Vol. 4, No. 4, pp. 406-25.
14. Simpson, W.F. and Stulberg, C.S. (1963) 'Species Identification of Animal Cell Strains by Immunofluorescence', Nature, Vol. 199, pp. 616-7.
15. Stulberg, C.S., Simpson, W.F. and Berman, L. (1961) 'Species-related antigens of mammalian cell strains as determined by immunofluorescence', Proc Soc Exp Biol Med, Vol. 108, pp. 434-9.
16. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007) 'MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0', Mol Biol Evol, Vol. 24, No. 8, pp. 1596-9.